

# 基于网络药理学和动物实验探究九转黄精丸对代谢相关脂肪性肝病的保护作用

王 涛<sup>1,2</sup>, 郝俊杰<sup>1,2</sup>, 李艳芹<sup>1,2</sup>, 李艳娟<sup>1,2</sup>, 字 磊<sup>1,2</sup>, 俞 捷<sup>1,2</sup>, 杨兴鑫<sup>1,2\*</sup>

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省南药可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500)

**摘要:** 目的 基于网络药理学和动物实验探究九转黄精丸治疗代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 作用机制。方法 通过 TCMSP、Pharm Mapper 和 SwissTargetPrediction 数据库收集九转黄精丸化学成分及其靶点; 利用 GeneCards 和 OMIM 数据库检索 MAFLD 相关的疾病靶点; 运用 DrawVennDiagram 软件构建九转黄精丸和疾病的共同靶点; 利用 STRING 11.0 数据库构建共同靶点蛋白相互作用网络; 运用 Cytoscape 3.8.2 构建药物-成分-靶点-疾病网络; 利用 Metascape 数据库进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 并构建活性成分-靶点-通路网络。高脂饮食喂养 12 周建立 MAFLD 大鼠模型, 造模同时给予九转黄精丸干预, 取各组大鼠肝脏及血清, 油红 O 染色观察肝组织形态变化, ELISA 法检测肝组织脂质以及炎症因子水平, Western blot 法检测肝组织炎症通路相关蛋白表达。结果 九转黄精丸与 MAFLD 共同靶点有 60 个; GO 富集分析涉及生物过程 1223 个条目、细胞组分 66 个条目和分子功能 94 个条目; KEGG 分析筛选出癌症通路、TNF-α 通路、NAFLD、PI3K-Akt 等 15 条信号通路。给予 MAFLD 大鼠九转黄精丸后, 肝组织病理形态得到改善, 肝组织 TC、TG、LDL-C 水平, 肝组织及血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平和肝组织 p-NF-κB/NF-κB、p-IκBα/IκBα 比值降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), PI3K、Akt 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 九转黄精丸对 MAFLD 具有一定的保护作用, 其机制可能与调控 PI3K-Akt、NF-κB、TNF 等炎症通路有关。

**关键词:** 九转黄精丸; 代谢相关脂肪性肝病; 网络药理学; 炎症; PI3K-Akt; NF-κB; TNF

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0979-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.051

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 是指除酗酒及其他明确的肝损伤原因而导致的, 以肝细胞内大量脂肪沉积和脂肪变性为主要病理变化的临床综合征, 严重者则发展为非酒精性脂肪肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌, 严重影响人类身体健康<sup>[1-4]</sup>。

九转黄精丸首载于《太平惠民和剂局方》, 由黄酒浸泡黄精、当归两药, 蜜制为丸, 具有补气养血之功。现代药理研究发现, 九转黄精丸具有抗衰老、抗炎、增强免疫力, 增强骨髓造血功能等作用, 目前已开发成中成药并广泛用于临床多种疾病防治<sup>[5-8]</sup>。方中黄精有补气养阴、健脾、润肺、益肾之功, 归脾、肺、肾经; 当归有补血活血、调经止痛、润肠通便之功, 为补血活血行瘀之要药, 归肝、心、脾经, 两者攻补兼施, 共奏补益气血、健脾益肾、活血行瘀之功。MAFLD 病位在肝, 涉及脾、胃、肾等脏腑, 证属本虚标实, 脾肾亏虚为本, 瘀浊血瘀为标<sup>[9]</sup>, 因此该方可缓解 MAFLD。

课题组前期研究表明, 九转黄精丸可有效调节线粒体缓解 MAFLD<sup>[8]</sup>, 但具体机制还需深入研究。本研究采用网络药理学方法, 以九转黄精丸的主要化学成分、靶点和 MAFLD 的疾病靶点为研究对象, 筛选出可能作用的靶点和通路, 并对其网络药理学结果进行实验验证, 进一步阐明九转黄精丸治疗 MAFLD 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学

1.1.1 九转黄精丸活性成分及靶点筛选 运用中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>), 检索出黄精、当归的所有化学成分, 以口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$  及化合物类药性 (DL)  $\geq 0.18$  为条件<sup>[10]</sup> 筛选黄精中活性成分; 以 OB  $\geq 30\%$  及 DL  $\geq 0.05$  为条件<sup>[11-13]</sup> 筛选当归中活性成分, 再利用 pharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmMapper>)、SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.cn/>) 对其活性成分进

收稿日期: 2022-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060707, 82104381); 云南省应用基础研究计划项目 (202001AZ070001-006, 2019IB009, 202101AY070001-077); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (202005AC160059); 云南省王林元专家工作站项目 (202105AF150058)

作者简介: 王 涛 (1999—), 男, 硕士生, 从事中药药效物质分析。Tel: 13330581606, E-mail: 970976801@qq.com

\* 通信作者: 杨兴鑫 (1987—), 男, 博士, 副教授, 从事中药药效物质分析。Tel: 18987686727, E-mail: yxx78945@163.com

行靶点预测，最后利用 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 种属选择为“*Homo sapiens*”得出关于人类蛋白的基因名称，并对其活性成分的相应靶点进行标准化处理。

1.1.2 MAFLD 疾病靶点筛选 通过 Genecards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>) 查找 MAFLD 的疾病靶点，以“nonalcoholic fatty liver disease”为关键词，得到关于 MAFLD 的疾病靶点，汇总去重后得到 MAFLD 对应靶点。

1.1.3 九转黄精丸治疗 MAFLD 潜在作用靶点预测 运用 DrawVennDiagram 软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 将活性成分相应靶点与疾病相应靶点上传，取其共同靶点，从而得到九转黄精丸治疗 MAFLD 的关键靶点。

1.1.4 中药-成分-靶点-疾病网络构建 将得到的九转黄精丸活性成分、疾病和药物关键靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建中药-成分-靶点-疾病网络，再运用 Network Analyser 功能对其节点进行分析，从中找出关键化合物。

1.1.5 蛋白质互作 (PPI) 网络构建 将九转黄精丸治疗 MAFLD 的交集蛋白上传到 STRING 11.0 数据库 (<http://string-db.org/>)，选择物种“*Homo sapiens*”，删除没有相互作用的靶点，再以 TSV 格式文本输出，最后通过 Cytoscape 3.8.2 对 PPI 网络图进行优化。

1.1.6 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 将九转黄精丸和 MAFLD 的共同靶点上传至 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/>)，选择物种“*Homo sapiens*”，对九转黄精丸和 MAFLD 的共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，再将结果导入微生信数据处理平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化。

1.1.7 九转黄精丸治疗 MAFLD 的成分-靶点-通路网络构建 将九转黄精丸与 MAFLD 疾病的共同蛋白以及通路蛋白所相互作用信息导入 Cytoscape 3.8.2 软件，从而构建九转黄精丸治疗 MAFLD 的成分-靶点-通路网络。

## 1.2 动物实验

1.2.1 试剂与药物 当归与滇黄精药材购自文山圣农道地药材种植农民专业合作社，经云南中医药大学俞捷教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根茎和百合科黄精属植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. 的根茎，药材切片、烘干备用。将黄精和黄酒以 10:2 的比例混合，将其闷润直至闷透，使用蒸汽灭菌器蒸制，烘干。取炮制后的黄精和当归以 1:1 比例混合，先用 12 倍量 95% 乙醇加热回流提取 2 h，再以 12 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 h<sup>[14-15]</sup>，合并 2 次滤液，减压浓缩回收乙醇，制备冻干粉，得率为 50%。高效 RIPA 细胞/组织裂解液（批号 20210310）、蛋白酶抑制剂 (PMSF)（批号 20210310）、5×蛋白上样缓冲液（批号 20200613）、5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液（批号 20210924）和 10×电转液（批号 20211109）购自北京索莱宝科技有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 092721220221）购自上海碧云天生物技术有限公司；蛋白预染 marker（批号 91246555）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；总胆固醇 (TC) 试剂盒（批号 20211224）、甘油三酯 (TG) 试剂盒（批号 20211224）、低密度脂蛋白 (LDL-C) 试剂盒（批号 20211224）、高密度脂蛋白 (HDL-C) 试剂盒（批号 20211224）购自南京建成生物工程研究所；10×TBS（批号 21224803）购自合肥白鲨生物科技有限公司；肿瘤坏死因子 (TNF-α) 检测试剂盒（批号 20211211）、白介素-1β (IL-1β) 检测试剂盒（批号 20211211）、白介素-6 (IL-6) 检测试剂盒（批号 20211211）购自上海酶联生物科技有限公司；磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抗体（批号 00097628）、蛋白激酶 B (Akt) 抗体（批号 10021367）、核因子 κB (NF-κB) 抗体（批号 00104885）、核因子 κB 抑制蛋白 (IκBα) 抗体（批号 10016277）购自武汉三鹰生物技术有限公司；磷酸化核因子 κB 抑制 (p-IκBα) 抗体（货号 340776）、磷酸化核因子 κB (p-NF-κB) 抗体（货号 310013）购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.2.2 动物 60 只 SPF 级 SD 雄性大鼠，体质量 (200±20) g，购于成都达硕实验动物有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2015-030，饲养于云南中医药大学动物实验中心 SPF 级动物实验室，室温 20~25 ℃，相对湿度 45%~65%，明暗交替 12 h/12 h，保持良好的通风，适应性喂养 1 周。动物实验经云南中医药大学动物实验中心伦理审查通过（编号 R-082018073）。

1.2.3 仪器 酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；纯水机（美国 Millipore 公司）；高速低温组织研磨仪、脱色摇床（武汉赛维尔生物科技有限公司）；多功能分子凝胶成像系统（德国耶拿公司）；电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）。

1.2.4 MAFLD 大鼠模型建立、分组及给药 大鼠随机分为正常组（生理盐水）、模型组（生理盐水）、白藜芦醇组 (40 mg/kg) 和九转黄精丸低、中、高剂量组 (2、4、8 g/kg)。除正常喂食普通饲料外，其余各组均喂食高脂饲料（普通饲料 79%、猪油 10%、蛋黄 10%、胆固醇 1%）12 周复制 MAFLD 模型，造模同时给药干预，九转黄精丸低、中、高剂量组灌胃给予 2、4、8 g/kg 药液；白藜芦醇组灌胃给予 40 mg/kg 药液；正常组和模型组灌胃给予等量生理盐水，每天 1 次。给药结束后，戊巴比妥钠麻醉大鼠，取腹主动脉血并解剖留取心脏。

1.2.5 生化指标检测 按相应试剂盒说明书检测各组大鼠肝组织 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。

1.2.6 肝组织形态学观察 将固定在 4% 多聚甲醛中的肝脏取出，随后放入 30% 蔗糖溶液中脱水，再进行聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物包埋，切片，最后油红 O 染色，光镜下观察，通过 Image J 软件对肝组织图像中的油滴进行处理及定量分析，从而评价细胞脂肪变性。

1.2.7 肝组织及血清炎症因子水平检测 取各组大鼠肝组织和血清，按照试剂盒说明书要求对样本进行预处理，再

按照说明书操作检测肝组织及血清肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平。

1.2.8 肝组织 PI3K、Akt、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达检测 取各组大鼠肝脏，加入适量 RIPA 裂解液并于匀浆机中研磨提取肝脏总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，随后加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液煮沸变性 10 min，分装并保存于 -20 °C 备用。蛋白样本进行电泳分离、转膜，随后依次进行封闭、洗膜、一抗孵育过夜、洗膜、二抗孵育 60 min、洗膜，最后与 ECL 发光液充分接触，于多功能数字凝胶成像分析仪暗箱中曝光，测定条带光密度 (OD) 值，以目的蛋白 OD 值/内参  $\beta$ -actin OD 值比值作为目的蛋白的相对表达。

1.2.9 统计学分析 通过 Graphpad Prime8 软件进行处理，计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 九转黄精丸活性成分和预测靶点 通过 TCMSP 数据库检索出九转黄精丸活性成分 163 个，其中黄精活性成分 38 个，当归活性成分 125 个。黄精活性成分以 OB $\geq 30\%$  和 DL $\geq 0.18$  为条件，筛选得到 12 个化合物；当归活性成分以 OB $\geq 30\%$  和 DL $\geq 0.05$  为条件，筛选得到 27 个化合物，去重后得到九转黄精丸活性成分共有 38 个。利用 TCMSP 得到 38 个化合物所对应的靶点信息，其中有 34 个化合物找到相对应的靶点信息，其余 4 个分别为 HJ9、HJ10、HJ11 和 DG26 并未找到对应靶点，利用 pharmMapper 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库进行成分的靶点预测，分别选择 “human protein targets only” 和 “Homo sapiens” 进行预测，结果分别以 “normalized fit score” 和 “probability” 排名前十的靶点，作为化合物所对应的靶点信息，最终 38 个化合物共有 495 个靶点信息，去重后得 128 个靶点信息，见表 1。

表 1 九转黄精丸活性成分信息

编号	MOL 编码	名称	中文名称	OB/%	DL	靶点数/个
HJ1	MOL001792	liquiritigenin	甘草素	32.76	0.18	12
HJ2	MOL002714	baicalein	黄芩苷	33.52	0.21	36
HJ3	MOL000359	sitosterol	豆甾醇	36.91	0.75	3
HJ4	MOL009763	(+)-syringaresinol-O- $\beta$ -D-glucoside	(+)-丁香树脂酚-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	43.35	0.77	1
HJ5	MOL006331	4',5-dihydroxyflavone	4',5-二羟基黄酮	48.55	0.19	8
HJ6	MOL002959	3'-methoxydaidzein	3'-甲氧基大豆昔元	48.57	0.24	19
HJ7	MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	新甘草昔	71.12	0.18	15
HJ8	MOL000546	diosgenin	薯蓣皂素	80.88	0.81	14
HJ9	MOL009766	zhonghualiaoine 1	—	34.72	0.78	10
HJ10	MOL003889	methylprotodioscin-qt	甲基原薯蓣皂苷-qt	35.12	0.86	10
HJ11	MOL009760	sibiricoside A-qt	黄精皂苷 A-qt	35.26	0.86	10
DG1	MOL000125	(-)- $\alpha$ -pinene	(-)- $\alpha$ -蒎烯	46.25	0.05	2
DG2	MOL001273	(S)-verbenone	马苯烯酮	50.63	0.06	3
DG3	MOL000162	$\beta$ -chamigrene	$\beta$ -花柏烯	31.99	0.07	19
DG4	MOL002029	(+)-cuparene	花侧柏烯	38.26	0.07	28
DG5	MOL002033	cis-thujopsene	罗汉柏烯	56.42	0.12	2
DG6	MOL002098	3-butylidene-7-hydroxyphthalide	3-丁烯基-7-羟基苯酞	62.67	0.08	10
DG7	MOL002111	3-butylidene phthalide	丁烯基苯酞	42.44	0.07	24
DG8	MOL002143	senkyunolide C	洋川芎内酯 C	46.80	0.08	11
DG9	MOL002144	senkyunolide D	洋川芎内酯 D	79.13	0.10	5
DG10	MOL002145	senkyunolide E	洋川芎内酯 E	34.40	0.08	11
DG11	MOL002201	cis-ligustilide	顺式藁本内酯	51.30	0.07	2
DG12	MOL003587	acoradiene	菖蒲二烯	36.72	0.07	16
DG13	MOL000360	ferritin	铁蛋白	39.56	0.06	16
DG14	MOL000389	ferulic acid	阿魏酸	54.97	0.06	14
DG15	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76	30
DG16	MOL008251	sedanolide	瑟丹内酯	62.46	0.07	8
DG17	MOL008255	$\alpha$ -acoradiene	$\alpha$ -菖蒲二烯	40.98	0.07	17
DG18	MOL008256	$\alpha$ -cedrene	$\alpha$ -柏木烯	55.56	0.10	5
DG19	MOL008258	(1R,4R,5S)-4-isopropenyl-1,8-dimethylspiro[4.5]dec-8-ene	(1R,4R,5S)-4-异丙烯基-1,8-二甲基[4.5]碳酸二乙酯-8-烯	40.65	0.07	14
DG20	MOL008259	2,6-di(phenyl)thiopyran-4-thione	2,6-二苯基-4-硫酮	69.13	0.15	4
DG21	MOL008265	2-valerylbenzoic acid	2-戊酰基苯甲酸	78.26	0.06	19
DG22	MOL008277	7,10-pentadecadiynoic acid	7,10-戊二酸	41.50	0.09	3
DG23	MOL008285	3-butylisobenzofuran-1(3H)-one	3-丁基苯酞	55.05	0.07	29
DG24	MOL008286	(-)camphoric acid	L-樟脑酸	99.13	0.07	6
DG25	MOL008287	(3E)-3-butylidene-7-hydroxy-2-benzofuran-1-one	(3E)-3-丁烯基-7-羟基-苯并呋喃-1-酮	42.17	0.08	12
DG26	MOL08252	senkyunolide	川芎内酯	68.28	0.07	10
A	MOL000358	$\beta$ -sitosterol	谷甾醇	36.91	0.75	37

注：HJ1~HJ11 为黄精的活性成分，DG1~DG26 为当归的活性成分，A 为黄精与当归共有的活性成分

2.2 MAFLD 疾病靶点收集 通过 GeneCards 数据库检索出 1 674 个作用靶点, OMIM 数据库检索出 463 个作用靶点, 合并后去重, 最终得到 MAFLD 潜在作用靶点 2 010 个。

2.3 九转黄精丸治疗 MAFLD 的关键靶点 将九转黄精丸和 MAFLD 疾病作用靶点导入到 DrawVennDiagram 软件, 得到共有靶点 60 个, 见图 1。

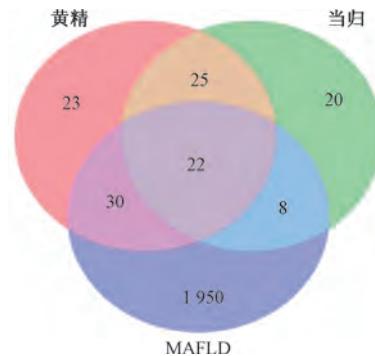
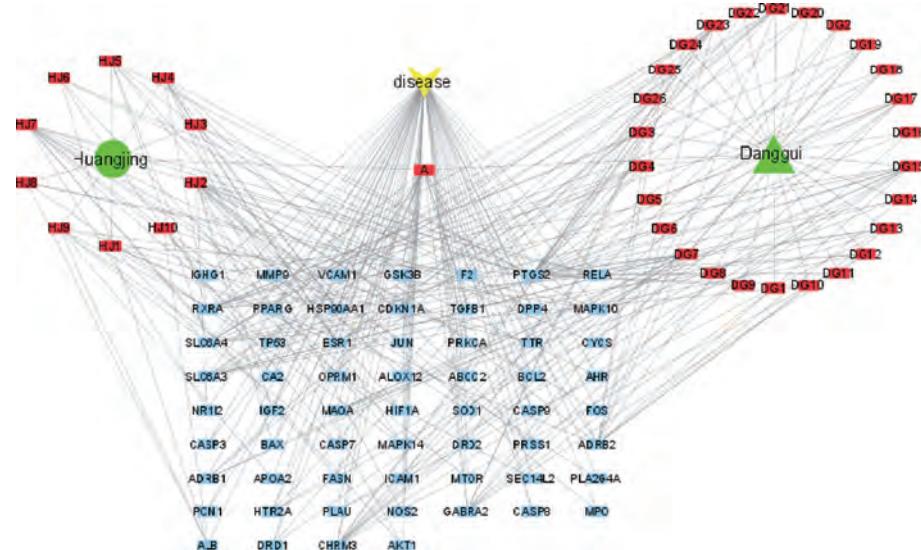


图 1 九转黄精丸和 MAFLD 交集靶点韦恩图

2.4 九转黄精丸中药-成分-靶点-疾病网络分析 将药物活性成分、药物与疾病的共同靶点等导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 构建中药-成分-靶点-疾病网络 (图 2), 共包括 100 个节点和 289 条边。节点的度越大, 表明该节点在整个网络中发挥的作用越大。通过网络分析, 选取了 Degree  $\geq 10$  的节点作为该网络关键活性成分和靶点, 得到化合物节点 7 个, 分别为 A ( $\beta$ -谷甾醇)、HJ2 (黄芩苷)、HJ7 (新甘草苷)、DG15 (豆甾醇)、HJ4 [ (+)-syringaresinol-O- $\beta$ -D-glucoside]、DG23 (3-丁基苯酞)、DG7 (丁烯基苯酞), 这些活性成分可能为该药发挥药效的主要活性成分; 以网络关键靶点为对象进行筛选, 得到靶点节点 7 个, 分别为前列腺素 G/H 合酶 2 (PTGS2)、 $\beta$ -2 肾上腺素能受体 (ADRB2)、视黄酸受体 RXR- $\alpha$  (RXRA)、毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3 (CHRM3)、钠依赖的 5-羟色胺转运体 (SLC6A4)、钠依赖性多巴胺转运体 (SLC6A3)、 $\gamma$ -氨基丁酸受体亚基  $\alpha$ -2 (GABRA2) 等, 这些靶点可能是该药发挥药理作用的关键靶点。



注: 黄色代表疾病, 绿色代表中药, 红色代表成分, 蓝色代表药物与疾病相互作用的靶点。

图 2 中药-成分-靶点-疾病相互作用网络图

## 2.5 九转黄精丸与 MAFLD 交集蛋白相互作用网络分析

将九转黄精丸与 MAFLD 的共同靶点导入 STRING 11.0 数据库进行分析, 并将其进行图像可视化优化, 得到交集蛋白间的相互作用网络 (图 3), 图中共有 58 个交集蛋白节点 (其余 2 个由于不存在蛋白相互作用, 所以将其删除), 487 条边, 每个蛋白的平均度值为 9.02, 说明该网络中交集蛋白之间关系密切。根据节点的 Degree 大小绘制出前 20 个关键蛋白图 (图 4), 其中排名前五的节点为白蛋白 (ALB)、蛋白激酶 B $\alpha$  (Akt1)、细胞肿瘤抗原 p53 (TP53)、转录因子 JUN (JUN)、基质金属蛋白酶-9 (MMP9)。

2.6 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 对九转黄精丸与 MAFLD 的交集基因进行 GO 功能富集分析 (图 5) 发现, 九转黄精丸活性成分的作用靶点基因主要富集在 1 223 个生物学过程, 主要包括对辐射的反应、细胞对有机氮化物、

无机物、脂多糖的反应、对细胞外刺激的反应、凋亡信号通路、类固醇激素反应等; 66 个细胞组分, 主要包括血液微粒、分泌颗粒腔、谷氨酸能突触、细胞外膜、细胞内小泡、神经元投射细胞质等; 94 个分子生物学功能, 主要包括蛋白结构特异性结合、转录因子结合、半胱氨酸型内肽酶活性参与细胞凋亡执行阶段、转录起始因子结合、核受体的活动、神经递质受体的活动等。

对九转黄精丸与 MAFLD 的交集基因进行 KEGG 通路富集分析, 筛选出 15 条信号通路 (图 6) 包括癌症通路 (pathway in cancer)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、非酒精性脂肪肝 (NAFLD)、内分泌抵抗 (endocrine resistance)、细胞凋亡 (apoptosis)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、NF- $\kappa$ B 信号通路 (NF- $\kappa$ B signaling pathway) 等。

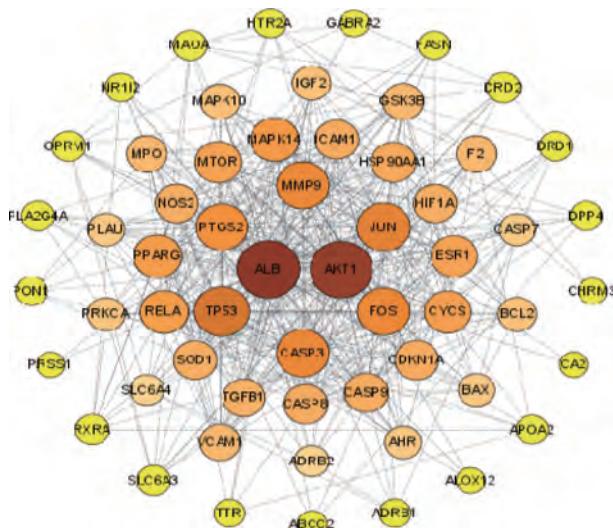


图3 九转黄精丸与MAFLD交集蛋白相互作用网络

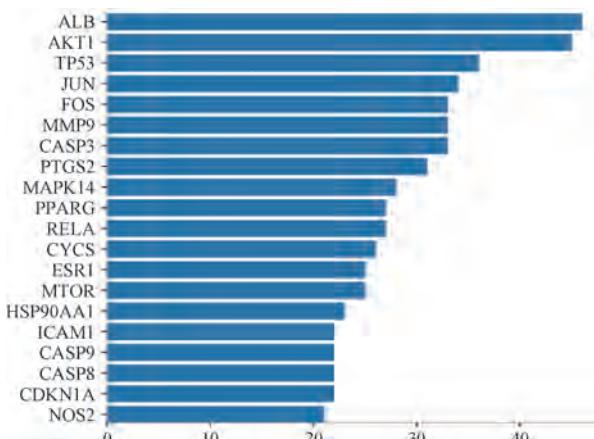


图4 PPI网络中核心节点

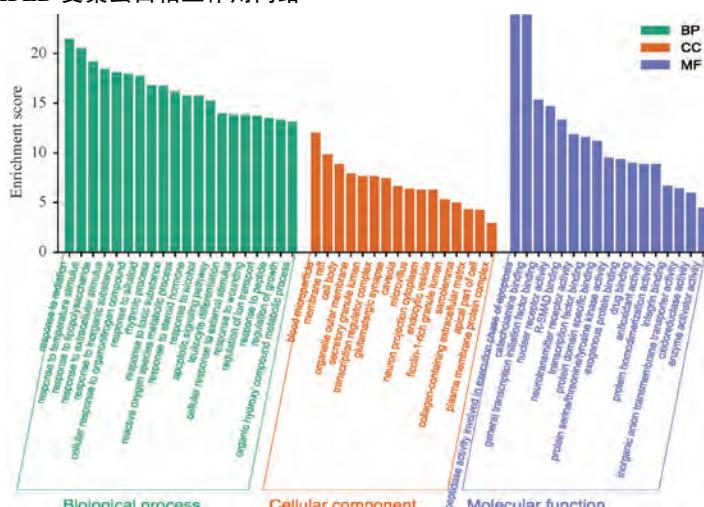


图5 GO功能富集分析

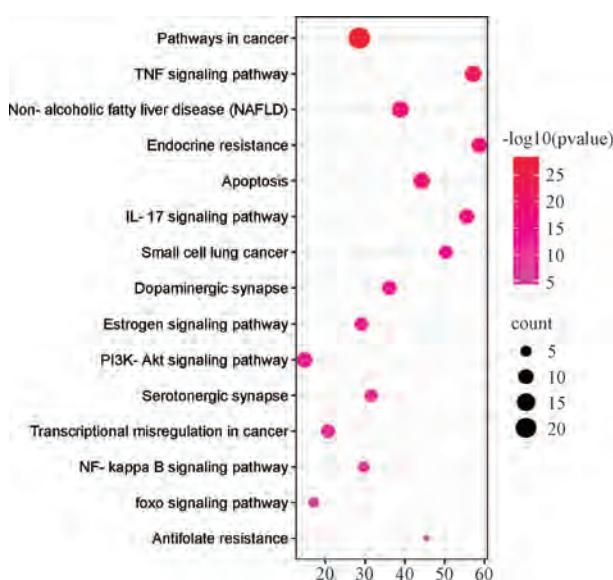


图6 KEGG信号通路富集分析

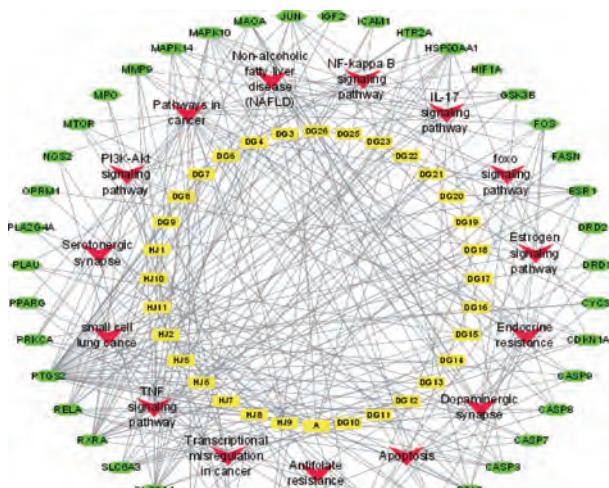
## 2.7 九转黄精丸治疗MAFLD的成分-靶点-信号通路网络

将KEGG分析得到的15条通路及其所涉及的基因靶点和基因靶点所对应的活性成分导入Cytoscape 3.8.2软件，构建成分-靶点-信号通路网络（图7），该网络共有90个节点和288条边，其中有15个通路节点、43个靶点基因节点、32个活性成分节点。网络中度值较高的靶点基因有PTGS2、Akt1、RXAX、RELA、SLC6A4等；度值较高的通路有癌症通路、TNF信号通路、PI3K-Akt信号通路、NAFLD、细胞凋亡、NF-κB信号通路、内分泌抵抗等。

## 2.8 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝脏脂质的影响

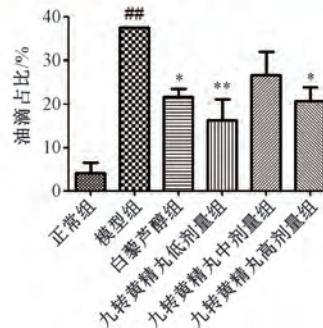
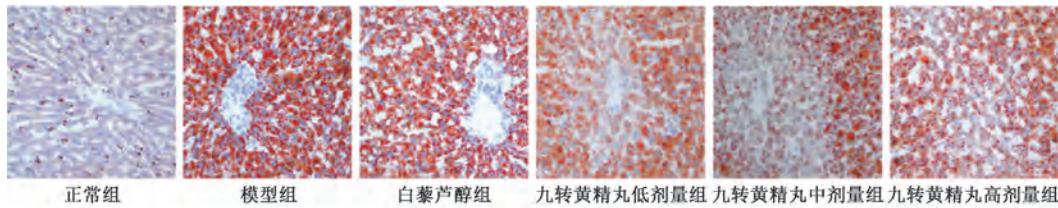
**2.8.1 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝组织脂肪堆积的影响** 如图8所示，与正常组比较，模型组大鼠肝脏组织出现明显的脂肪变性，脂滴增加（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，各给药组肝脏组织脂滴均减少（ $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ），表明九转黄精丸可降低肝组织中脂肪堆积。

**2.8.2 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝组织TC、TG、LDL-C和HDL-C水平的影响** 如图9所示，与正常组比较，模型组大鼠肝组织TC、TG、LDL-C水平升高（ $P<0.01$ ），表明



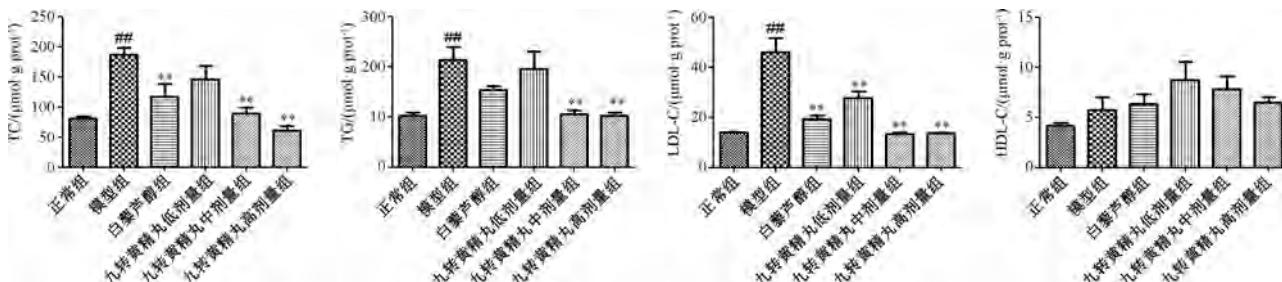
注：黄色代表成分，红色代表通路，绿色代表成分与通路相互作用的靶点。

图7 九转黄精丸治疗MAFLD的成分-靶点-通路网络



注：与正常组比较，\*\* $P<0.01$ ；与模型组比较，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ 。

图8 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝组织脂肪堆积的影响 ( $\times 200$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )



注：与正常组比较，\*\* $P<0.01$ ；与模型组比较，\*\* $P<0.01$ 。

图9 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝组织TC、TG、LDL-C和HDL-C水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

2.9.2 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝组织PI3K、Akt、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达的影响 如图11所示，与正常组比较，模型组大鼠肝组织PI3K、Akt蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<$

高脂饮食诱导大鼠肝脏脂质紊乱；与模型组比较，白藜芦醇组肝组织TC、LDL-C水平降低 ( $P<0.01$ )，TG水平呈现下降趋势，但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，表明白藜芦醇对高脂饮食引起的肝脏脂质紊乱具有调节作用；与模型组比较，九转黄精丸各剂量组TC、TG、LDL-C水平降低 ( $P<0.01$ )，表明九转黄精丸对MAFLD大鼠肝脏脂质紊乱具有抑制作用。

2.9 九转黄精丸对MAFLD大鼠炎症因子和炎症通路的影响

2.9.1 九转黄精丸对MAFLD大鼠血清及肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平的影响 如图10所示，与正常组比较，模型组大鼠血清及肝组织炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )；与模型组比较，白藜芦醇组血清及肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，九转黄精丸低、高剂量组血清IL-6水平，低、中剂量组肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平和高剂量组肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

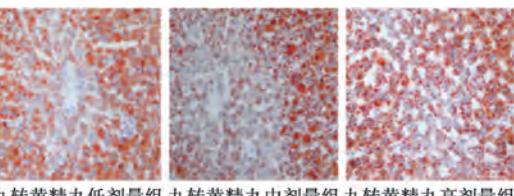
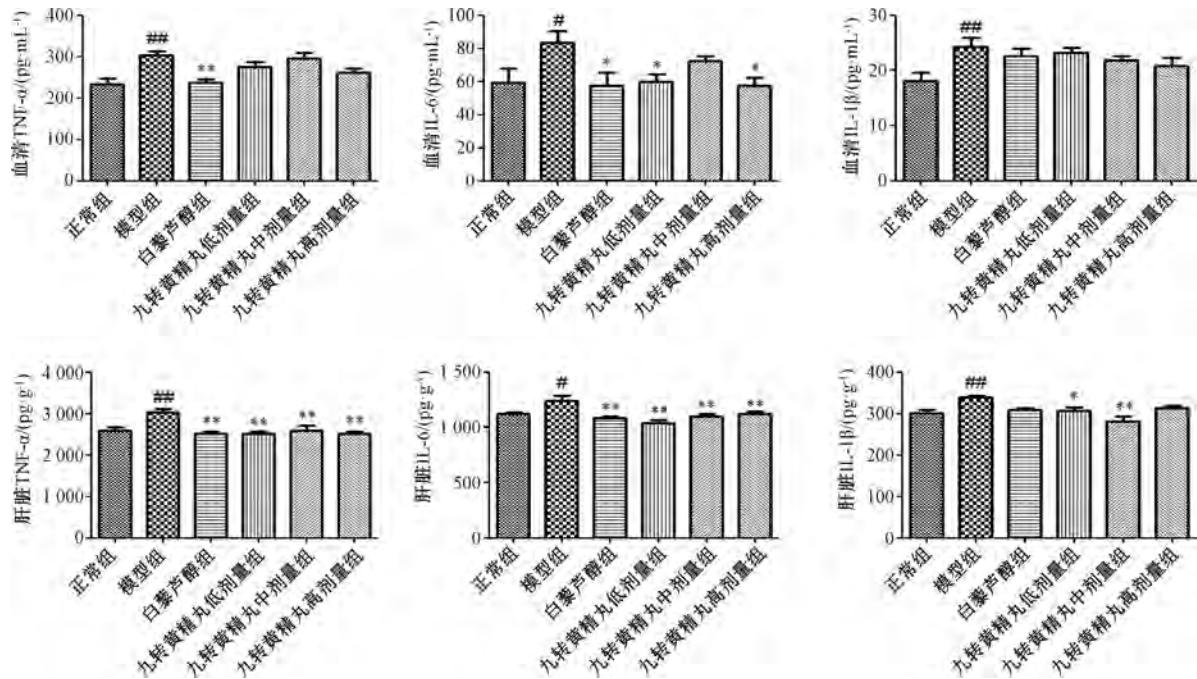


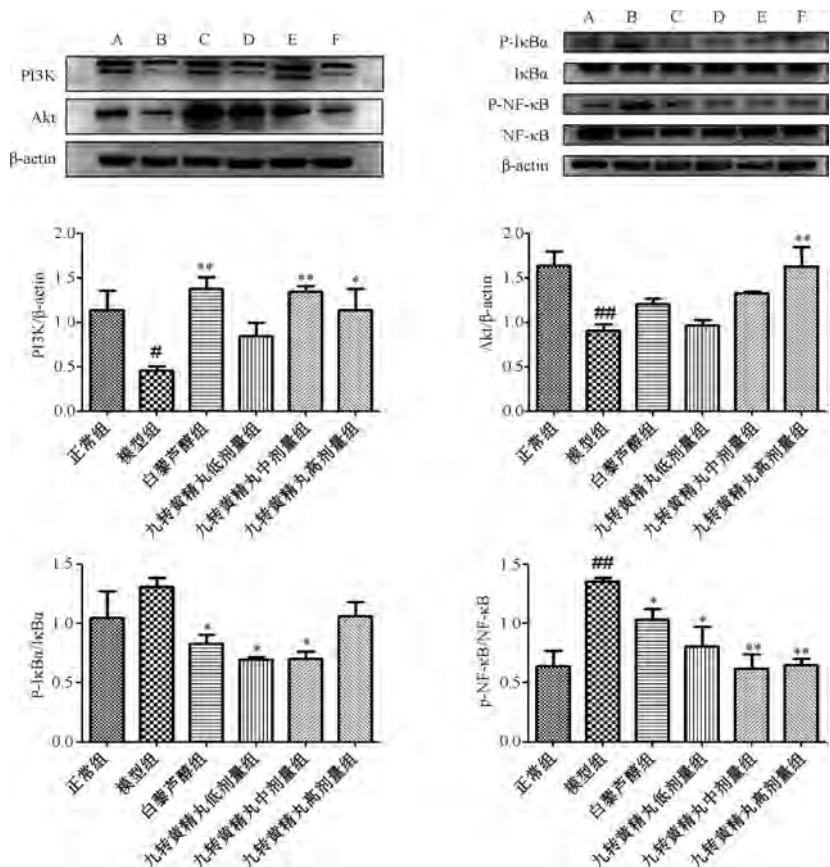
图10 九转黄精丸对MAFLD大鼠肝组织炎症因子表达的影响

0.01)，p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B比值升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，白藜芦醇组PI3K蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值降低 ( $P<0.05$ )，九转黄精丸



注：与正常组比较， $^{\#}P<0.05$ ,  $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$ 。

图 10 九转黄精丸对 MAFLD 大鼠血清及肝组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为白藜芦醇组，D~F 为九转黄精丸低、中、高剂量组。与正常组比较， $^{\#}P<0.05$ ,  $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$ 。

图 11 九转黄精丸对 MAFLD 大鼠肝组织 PI3K、Akt、NF-κB、IκBα 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

低、中剂量组 p-NF-κB/NF-κB、p-IκBα/IκBα 比值降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，中、高

剂量组 PI3K 蛋白表达和高剂量组 Akt 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

### 3 讨论

课题组前期研究表明，九转黄精丸可通过恢复线粒体功能而缓解高脂饮食诱导的MAFLD，包括保护线粒体超微结构，减少氧化应激损伤，改善能量代谢和调节脂肪酸 $\beta$ 氧化基因表达<sup>[8]</sup>。本研究采用网络药理学及动物实验进一步探究其具体机制，PPI和KEGG信号通路富集分析显示，九转黄精丸可能通过ALB、Akt1、TP53、JUN、MMP9等靶点以及TNF、PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B、IL-17等信号通路治疗MAFLD。

NF- $\kappa$ B信号通路在炎症反应中起关键作用，NF- $\kappa$ B的活性受I $\kappa$ B的调节，两者结合形成三聚体，导致NF- $\kappa$ B无法核易位，从而无法在细胞核内发挥其对多种炎症因子基因（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等）及免疫相关基因表达的调控作用<sup>[16]</sup>。相反，当细胞受到如细胞因子等细胞外信号刺激时，I $\kappa$ B $\alpha$ 激酶的活性磷酸化导致I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白降解，促进NF- $\kappa$ B核易位，NF- $\kappa$ B转移到细胞核内发挥其对多种炎症因子基因及免疫相关基因表达调控作用。此外，TNF- $\alpha$ 也能促进NF- $\kappa$ B的活性，并且在各种促炎因子作用下，NF- $\kappa$ B和TNF- $\alpha$ 相互作用构成炎症反应网络，进而发挥促炎作用<sup>[17]</sup>，且TNF等促炎因子还可以激活许多途径，如NF- $\kappa$ B和丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）途径。TNF可结合肿瘤坏死因子受体1（TNFR1）和肿瘤坏死因子受体2（TNFR2）2种受体，主要以TNFR1为主，来发挥多种细胞效应，诱导线粒体肿胀，从而导致肝损伤<sup>[18-19]</sup>。PI3K通过磷脂酰肌醇三磷酸（PIP<sub>3</sub>）调控Akt的表达，Akt则可以靶向NF- $\kappa$ B来调节多个基因表达，而这些基因都与炎症有关<sup>[20]</sup>。动物实验结果显示，九转黄精丸可降低MAFLD大鼠血清和肝组织中炎症因子水平，升高肝组织PI3K、Akt蛋白表达升高，降低p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值。

综上所述，九转黄精丸可通过调节PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B、TNF等炎症通路抑制炎症反应而缓解MAFLD。

### 参考文献：

- [1] 张艳鹤, 郑亚云, 芦超, 等. 余甘子鞣质对代谢相关脂肪性肝病小鼠脂质代谢及肠道菌群的调节作用[J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 287-293.
- [2] Byrne C D, Targher G. NAFLD: a multisystem disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S47-S64.
- [3] Fu K, Wang C, Ma C, et al. The potential application of Chinese medicine in liver diseases: A new opportunity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 771459.
- [4] 池肇春. 代谢相关脂肪性肝病肝外并发症研究进展与现状[J]. 世界华人消化杂志, 2022, 30(1): 1-16.
- [5] 魏宪纯, 李明杰, 张春蕾. 九转黄精丸对衰老小鼠皮肤组织形态学的影响 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(3): 278.
- [6] 杨晶莹, 高萌, 左爱仁, 等.  $\beta$ -catenin RNA干扰对黄精丸治疗学习记忆障碍小鼠的信号通路机制的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 53-62.
- [7] 杨晶莹, 肖移生, 肖爱娇, 等. 黄精丸防治阿尔茨海默病的可行性探析及研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 46-52.
- [8] Mu J K, Zi L, Li Y Q, et al. *Jiuzhuan Huangjing Pills relieve mitochondrial dysfunction and attenuate high-fat diet-induced metabolic dysfunction-associated fatty liver disease* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 112092.
- [9] 许勇, 陶颖, 苟小军. 非酒精性脂肪肝中医病因病机探析 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2586-2589.
- [10] Zhang Y F, Huang Y, Ni Y H, et al. Systematic elucidation of the mechanism of geraniol via network pharmacology [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1069-1075.
- [11] 刘兰椿, 刘超, 毛启远, 等. 基于网络药理学探讨当归补血汤治疗化疗所致心肌损伤的机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(20): 3441-3447.
- [12] 徐婷, 麦葭沂, 向俊, 等. “黄芪-当归”药对主要活性成分的网络药理学研究 [J]. 中药材, 2017, 40(9): 2195-2201.
- [13] 姚楠, 丁茂鹏, 王志旺, 等. 基于网络药理学研究当归平喘的分子机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(24): 3250-3253.
- [14] 秦盼月, 尚瑾, 俞捷, 等. 滇黄精对糖尿病大鼠创面愈合的促进作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(6): 61-65.
- [15] Xiong H, Li N, Zhao L Q Q, et al. Integrated serum pharmacacochemistry, metabolomics, and network pharmacology to reveal the material basis and mechanism of Danggui Shaoyao San in the treatment of primary dysmenorrhea [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 942955.
- [16] Zappavigna S, Cossu A M, Grimaldi A, et al. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2605.
- [17] 孙婷婷, 李京涛, 魏海梁, 等. TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路调控非酒精性脂肪性肝病的研究现状 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9): 2095-2098.
- [18] 王丽娜, 罗竹, 黄小朵, 等. 基于TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路对IPF炎症与焦亡的探讨 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(46): 190-191.
- [19] 李承宗. RIP1与TNF- $\alpha$ 诱导信号通路关系的研究进展 [J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(19): 66-69.
- [20] Nie Y J, Wang Z X, Chai G S, et al. Dehydrocostus lactone suppresses LPS-induced acute lung injury and macrophage activation through NF- $\kappa$ B signaling pathway mediated by p38 MAPK and Akt [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1510.